

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 A61K 38/02		A1	(11) 国際公開番号 WO99/38523 (43) 国際公開日 1999年8月5日(05.08.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00414		(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (DE, FR, GB)	
(22) 国際出願日 1999年2月1日(01.02.99)		添付公開書類 国際調査報告書	
(30) 優先権データ 特願平10/32384 1998年1月30日(30.01.98) JP		(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama, (JP)	
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 瀬谷 司(SEYA, Tsukasa)[JP/JP] 〒631-0022 奈良県奈良市鶴舞西町二丁目10番 E-106 Nara, (JP)		(73) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)	

(54) Title: CYTOKINE INDUCERS COMPRISING M161Ag

(54) 発明の名称 M161Agからなるサイトカイン誘発剤

(57) Abstract

Cytokine inducers comprising a membrane protein M161Ag which is contained in cells latently infected with *Mycoplasma fermentans* such as a human myelocytic leukemia cell line P39(+). These cytokine inducers comprising the membrane protein M161Ag or gene recombination products thereof are useful as immunomodulators or remedies for various immunological diseases.

本発明は、ヒト骨髓性白血病細胞株P 3 9 (+)などのマイコプラスマ・ファーメンタンス (*Mycoplasma fermentans*) の潜伏感染細胞に含まれる、膜蛋白質M 1 6 1 A g からなるサイトカイン誘発剤を提供する。本発明は、蛋白質M 1 6 1 A g 又はその遺伝子組換え産物からなるサイトカイン誘発剤に関し、免疫調節剤や各種免疫関連疾患の治療剤として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E	アラブ首長国連邦	E S	スペイン	L I	リヒテンシュタイン	S G	シンガポール
A L	アルハニア	F I	コインチンド	L K	スリ・ランカ	S I	スロヴェニア
A M	マルメニア	F P	フランス	L R	リベリア	S K	スロvakia
A T	オーストリア	G A	ガボン	L S	レソト	S L	シエラ・レオネ
A U	オーストラリア	G B	英國	L T	リトアニア	S N	セネガル
A Z	アセルハイジヤン	G D	ダ・ナダ	L U	ルクセンブルグ	S Z	スウェーデン
B A	ボズニア・ヘルツェゴビナ	G E	ギルギア	L V	ラトヴィア	T D	チャード
B B	バルハドス	G H	ガーナ	M C	モナコ	T G	トーゴー
B E	ベルギー	G M	ガンビア	M D	モルドバ	T J	タジキスタン
B F	ブルギナ・ファソ	G N	ギニア	M G	マダガスカル	T M	トルクメニスタン
B G	ブルガリア	G W	ギニア・ビサオ	M K	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T R	トルコ
B J	ベナン	G R	ギリシャ	共和国	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T T	トリニダード・トバゴ
B R	ブルジル	H E	クロアチア	M L	マリ	U A	ウクライナ
B Y	ベラルーシ	H U	ハンガリー	M N	モニコル	U G	ウガンダ
C A	カナダ	I D	インドネシア	M R	モーリタニア	U S	米国
C E	中央アフリカ	I E	アイルランド	M W	マラウイ	U Z	ウズベキスタン
C G	コートジボアール	I L	イスラエル	M X	メキシコ	V N	ヴィエトナム
C H	スイス	I N	インド	N E	ニジエール	Y U	ユーコンラビア
C I	コートジボアール	I S	アイスランド	N L	オランダ	Z A	南アフリカ共和国
C M	カムルーン	I T	イタリア	N O	ノルウェー	Z W	ジンバブエ
C N	中国	J P	日本	N Z	ニュージーランド		
C U	キューバ	K E	ケニア	P L	オランダ		
C Y	キプロス	K G	キルギスタン	P T	ボルトガル		
C Z	キエンコ	K P	北朝鮮	R O	ルーマニア		
D E	ドイツ	K R	韓国	R U	ローヌ		
D K	デンマーク	K Z	カザフスタン	S D	スー丹		
E E	エストニア	L C	セントルシア	S E	スウェーデン		

明細書

M 1 6 1 A g からなるサイトカイン誘発剤

技術分野

本発明は、蛋白質M 1 6 1 A g を含有してなるサイトカイン誘発剤 (Cytokine Inducer) 、免疫調整剤、免疫療法剤に関する。

背景技術

M 1 6 1 A g は、ヒト骨隨性白血病細胞株 P 3 9 (+) などのマイコプラズマファーメンタス (*Mycoplasma fermentans*) の潜伏感染細胞に含まれる膜タンパク質であり、第2補体活性化経路の活性化や補体C 3 の吸着などの機能を有する。このタンパク質の単離精製、及びモノクロナール抗体の作製はすでに報告されている (M a t s u m o t o et al. , J. Exp. Med. 1 8 1 , 1 1 5 - 1 2 5 (1 9 9 5))。また大部分の一次構造も報告されている (N a t u r e Med. , 3 : 1 2 6 6 - 1 2 7 0 (1 9 9 7)) (特開平9-157295号)。

マイコプラズマファーメンタス (*M. fermentans*) はH I V感染患者、白血病や骨髄腫などのがん患者、再生不良性貧血患者など免疫能が低下する病態下で陽性になる細胞内寄生細菌である。主な寄生宿主は、インビトロ (*in vitro*) でヒト腫瘍細胞株と同定されている。マイコプラズマファーメンタス (*M. fermentans*) 陽性例ではM 1 6 1 A g も必ず陽性になることが知られている。

また、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) は別のグループの報告では、リンパ球低下の一因とされ、A I D S 発症のコファクターとされてきた。また、マイコプラズマファーメンタス (*M. fermentans*) はインビトロ (*in vitro*) で白血球系を刺激してサイトカインを誘導することが示唆されてきた。これらの現象は他のマイコプラズマ種では起きず、ファーメンタスのみに見られることから、マイコプラズマファーメンタス (*M. fermentans*) に特有な遺伝子産物のあるものがリンパ球低下、サイトカイン誘導を指令すると考えられてきた。しかし、いかなる物

質がその活性に責任をもつか不明であった。本発見者はマイコプラズマファーメンタンス (*M. fermentans*) のこれら生物活性を司る物質を精製標品を用いたアッセイで同定、その生物活性の範囲を明確化し、本発明を完成した。

本発明の目的は、M 1 6 1 A g の生理活性・サイトカイン誘導活性を用いて、M 1 6 1 A g からなるサイトカイン誘発剤、免疫調整剤及び免疫療法剤を提供し、各種免疫関連疾患の治療に役立てることにある。

発明の開示

本発明者は、M 1 6 1 A g の精製標品を用いて、単球、リンパ球などの免疫担当細胞を刺激し、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6などの炎症サイトカイン、IL-10、IL-12のリンパ球活性化サイトカインを効果的に誘導し、また、感染細胞をアボトーシス化で排除することに成功し、本発明を完成した。

本発明は、蛋白質M 1 6 1 A g 又はその遺伝子組換え産物を含有しているサイトカイン誘発剤 (Cytokine Inducer) 、免疫調整剤又は免疫関連疾患の治療剤に関する。

また、本発明は、蛋白質M 1 6 1 A g 又はその遺伝子組換え産物の治療上充分な量を投与することからなるサイトカインの欠乏に起因する疾患、免疫関連疾患、免疫疾患の治療方法に関する。さらに、本発明は、サイトカイン誘発剤、免疫調整剤又は免疫関連疾患の治療剤を製造するための蛋白質M 1 6 1 A g 又はその遺伝子組換え産物の使用に関する。

本発明のM 1 6 1 A g のDNAは、マイコプラズマファーメンタンス (*M. fermentans*) を感染・増殖させたヒト骨髓性白血病細胞株P 39、ヒト線維芽細胞株W138などからゲノムDNA (genome) として得られる。これらのDNAはTGA (大腸菌、ヒトにおいては終止コドン、マイコプラズマではトリプトファン) を5つ含むので、これらをTGGに置き換えてpETなどヒスタグ (His-tag) のついた大腸菌の発現ベクターに組み込み、菌内で強制発現させる。こうして得られた大量の遺伝子組換え産物をニッケル・セファロースカラムとM K 5 3 (抗M 1 6 1 A g 抗体) セファロースカラムで精製する。本標品は大腸菌由来のバイロジエン-フリーを確認してある。

こうして精製されたM 1 6 1 A gは分子量4 5 kDaでN末端システィンにパルミチン酸などの脂質が結合している。M 1 6 1 A gを細胞と混合すると、この脂質を介して一部が細胞に取り込まれる。インビトロで末梢血、単球、単球系の細胞株にM 1 6 1 A gを混合すると、24時間以内に培養上清にIL-1 β 、TNF- α 、IL-6、などマクロファージ由来の炎症性サイトカイン、IL-10、IL-12など、リンパ球のモジュレーター活性をもつサイトカインが同定される。活性をリポオリサッカライド(lipopolysaccharide(LPS))と比較すると、同一重量(例えば10 nM)を用いた場合、上記全てのサイトカインはLPSよりM 1 6 1 A gでより強力に誘導される。なお、本実験に用いた単球はエルトリエーションシステム(elutriation system(Beckman))を用いたカルブ(Karp)らの方法によるもので95%以上の精製度である。従って、これらのサイトカインはM 1 6 1 A gが単球を直接刺激して誘導されたと結論しうる。

M 1 6 1 A gが、マイコプラズマ由来でヒトサイトカインを強力に誘導する生理活性物質であることが証明でき、かつ、この作用を通して、ヒト基本免疫系(innate immunity)を活性化し、免疫低下時の宿主免疫を改善すること、さらにリンパ球など感染細胞をアボトーシス死に陥らしめ、アレルギー等の過度の免疫活性化の病態を押さえることが判明した。

以上からM 1 6 1 A gは単球系を介して多彩な免疫系のモジュレーターとしてのサイトカインを誘導することが証明された。

図面の簡単な説明

第1図は、単球系細胞株THP-1による、本発明の蛋白質M 1 6 1 A gのIL-1 β 、TNF- α 及びIL-6の誘発作用を示すものである。

第1図の左側は細胞溶解物からのデータであり、右側は条件培地でのデータである。

第2図は、精製末梢血単球による、本発明の蛋白質M 1 6 1 A gのIL-1 β 、TNF- α 及びIL-6の誘発作用を示すものである。

第2図の左側は細胞溶解物からのデータであり、右側は条件培地でのデータである。

第3図は、精製末梢血単球による、本発明の蛋白質M161AgのIL-10（第3図左側）及びIL-12（第3図右側）の誘発作用を示すものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の蛋白質M161Agで誘発されるサイトカインは種々の生理活性を有することが知られている。例えば、IL-1は、T細胞活性化、好中球活性化、抗腫瘍活性の亢進、線維芽細胞増殖、ACTH・GHなどの分泌増加などの作用が知られている。TNF- α は細胞の増殖、分化に関与する因子であり、特に腫瘍壊死作用を有する因子である。また、プロスタグランジンや血小板活性化因子の産生を増強し、さらには抗ウイルス作用を有するとの報告もされている。

IL-6は、B細胞の抗体産生細胞への分化を促進させ、T細胞やマイクロファージの分化・増殖を促進させる作用を有する。IL-10はT細胞を増殖させ、IL-12は細胞障害性Tリンパ球（CTL）やNK細胞を活性化する作用を有する因子である。

M161Agはサイトカイン誘発活性を種々の免疫関連疾患、がんなどの治療に適用できる。

本発明の有効成分は、ヒト基本免疫系を活性化するものであるから、基本免疫系が関与する各種の免疫関連疾患の治療剤として有用である。免疫疾患としては、例えば、アレルギー疾患、自己免疫疾患などが挙げられる。

本発明の蛋白質M161Agは、細胞株P39（+）などの細胞からの抽出物を使用することもできるが、例えば、特開平9-157295号などに開示されているDNAを用いて、各種の宿主細胞を用いてこれを発現させたもの（遺伝子組換え産物）を用いててもよい。

本発明の蛋白質M161Agは、その活性を維持できる範囲で、1個以上のアミノ酸が消失してもよいし、1個以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していくてもよいし、1個以上のアミノ酸が付加していくてもよい。

また、本発明のM161Agは、蛋白質のままで使用するこもできるが、N末端やアミノ酸鎖の適当な位置を脂肪酸などで修飾したものや、癌細胞など細胞に特異的な抗体と結合などの修飾をして使用することもできる。

本発明の有効成分となる蛋白質M161A gの投与量は、患者の状態や疾病の種類によっても異なるが、通常は1日当たり、0.01～100ng/kg、好ましくは0.1～10ng/kgであり、通常は1日1～3回投与される。

投与方法としては、静脈注射、皮下注射などが好ましいが、舌下錠や直腸投与などの非経口投与であれば特に制限はない。

投与形態としては、通常の蛋白質の製剤化法により製剤化されたものを使用できる。また、リポソーム製剤などの乳化剤として使用することもできる。

実施例

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

単球系細胞株T H P - 1 (10^6) に6ng、12ngのM161A gを加えた。24時間後に培養上清を回収し、各種サイトカインをサンドイッチELISA法で定量した。LPSとの比較データも併せて第1図に示す。

実施例 2

精製末梢血単球 (10^6) に2.4ng、12ngのM161A gを加えた。24時間後に培養上清を回収し、各種サイトカインをサンドイッチELISA法で定量した。LPSとの比較データも併せて第2図に示す。

実施例 3

精製末梢血単球 (10^6) に2.4ng/ml、12ng/mlのM161A gを加えた。24時間後に培養上清のIL-10、IL-12を定量した。結果を第3図に示す。

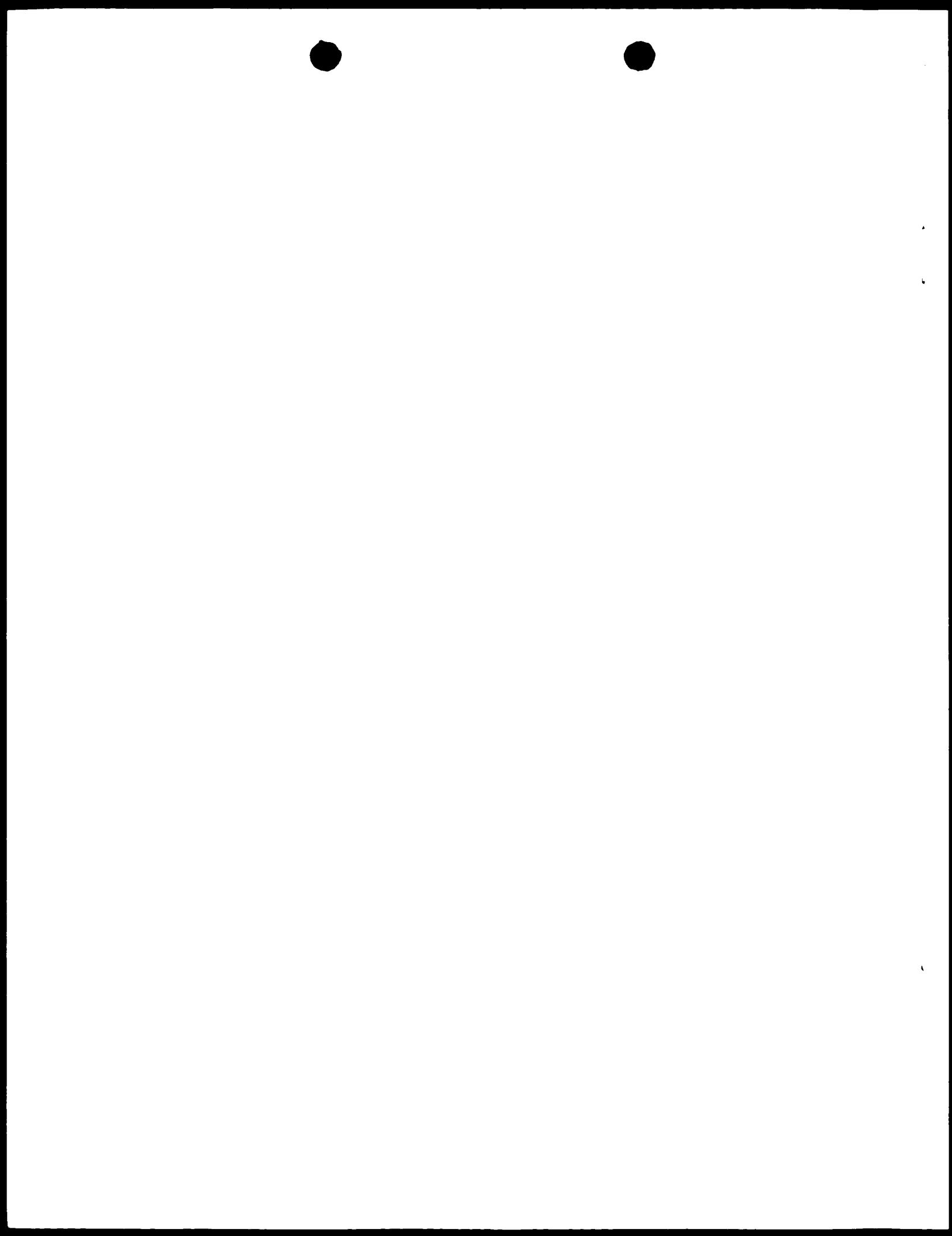
産業上の利用可能性

本発明はマイコプラスマファーメンタンスの膜蛋白質、M161A gの新規な

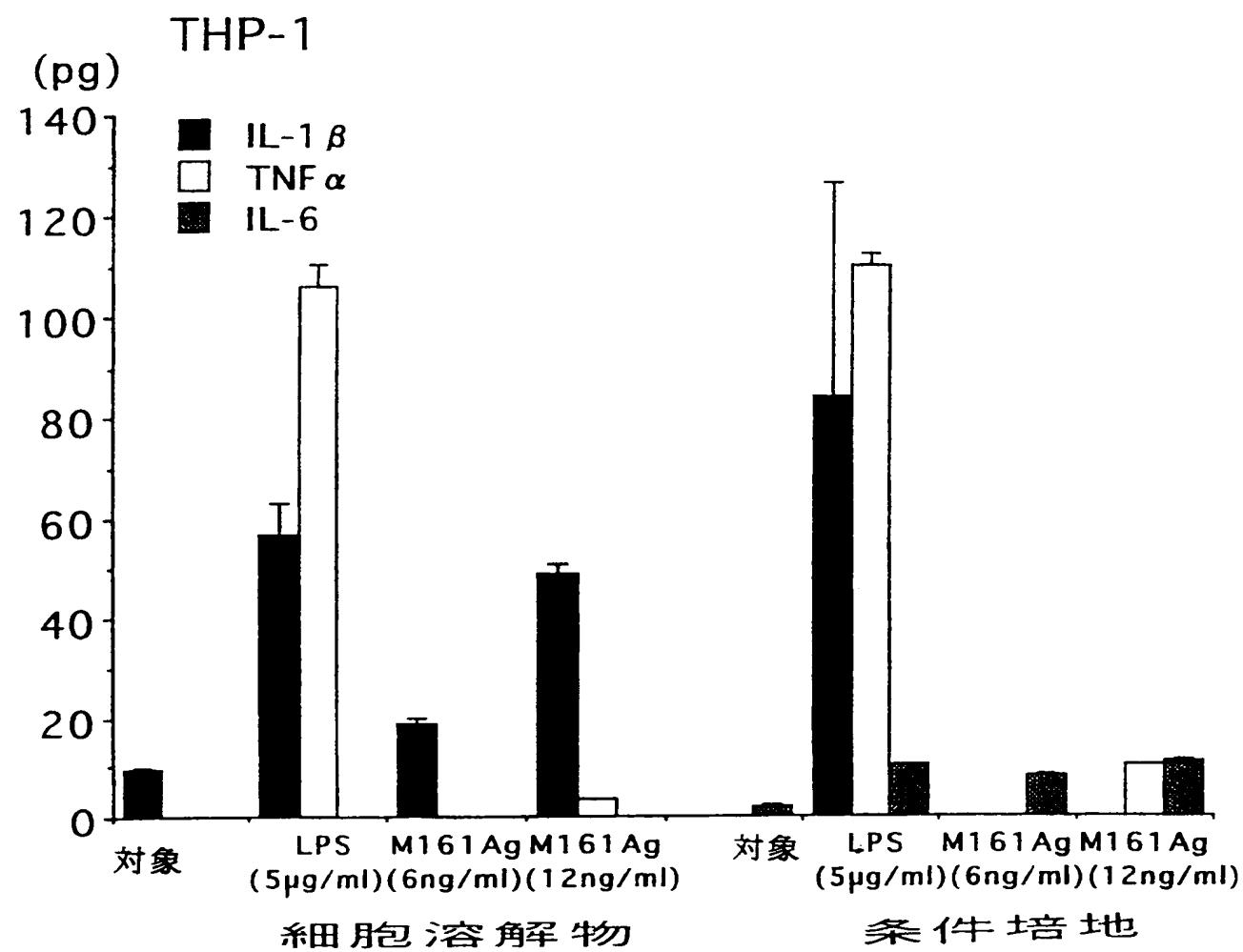
生理活性に基づく薬剤を提供する。M161Agは強力なサイトカイン誘発活性を示し、アレルギー時、免疫低下時などの免疫調節薬として利用できる。

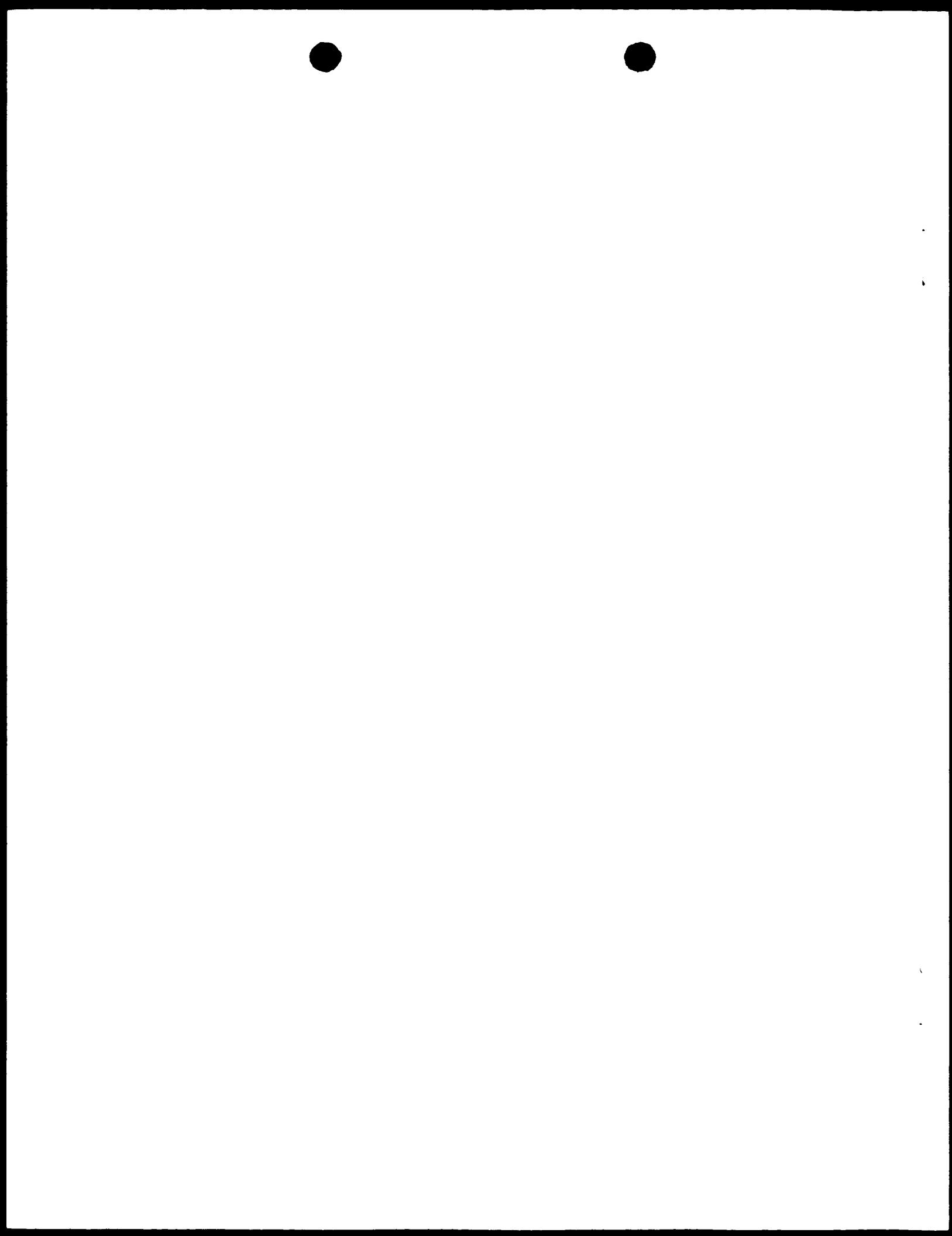
請 求 の 範 囲

1. 蛋白質M 1 6 1 A g又はその遺伝子組換え産物を含有してなるサイトカイン誘発剤。
2. 誘導されるサイトカイン類が、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-12及び/又はINF- γ である請求の範囲第1項に記載のサイトカイン誘発剤。
3. サイトカイン誘発剤が免疫調節剤として使用される請求の範囲第1又は2項に記載のサイトカイン誘発剤。
4. 免疫調節剤が免疫関連疾患の治療剤として使用される請求の範囲第3項に記載のサイトカイン誘発剤。
5. 蛋白質M 1 6 1 A g又はその遺伝子組換え産物が、そのN末端が脂肪酸でアシル化されたものである請求の範囲第1～4項のいずれか一項に記載のサイトカイン誘発剤。
6. 蛋白質M 1 6 1 A g又はその遺伝子組換え産物を含有してなる免疫疾患治療剤。
7. 蛋白質M 1 6 1 A g又はその遺伝子組換え産物の治療上充分な量を投与することからなるサイトカインの欠乏に起因する疾患の治療方法。
8. 蛋白質M 1 6 1 A g又はその遺伝子組換え産物の治療上充分な量を投与することからなる免疫疾患の治療方法。
9. サイトカイン誘発剤を製造するための蛋白質M 1 6 1 A g又はその遺伝子組換え産物の使用。
10. 免疫疾患治療剤を製造するための蛋白質M 1 6 1 A g又はその遺伝子組換え産物の使用。

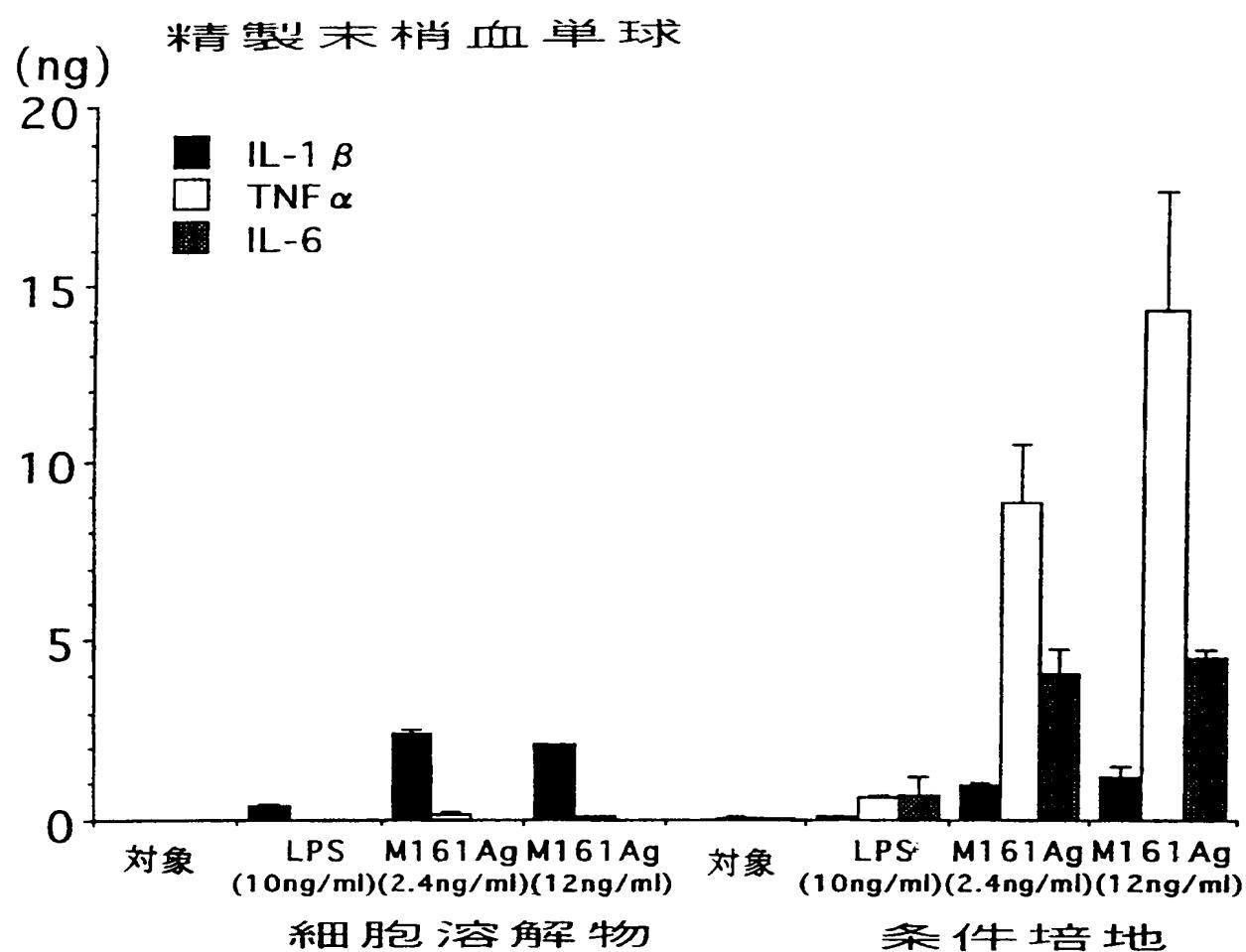


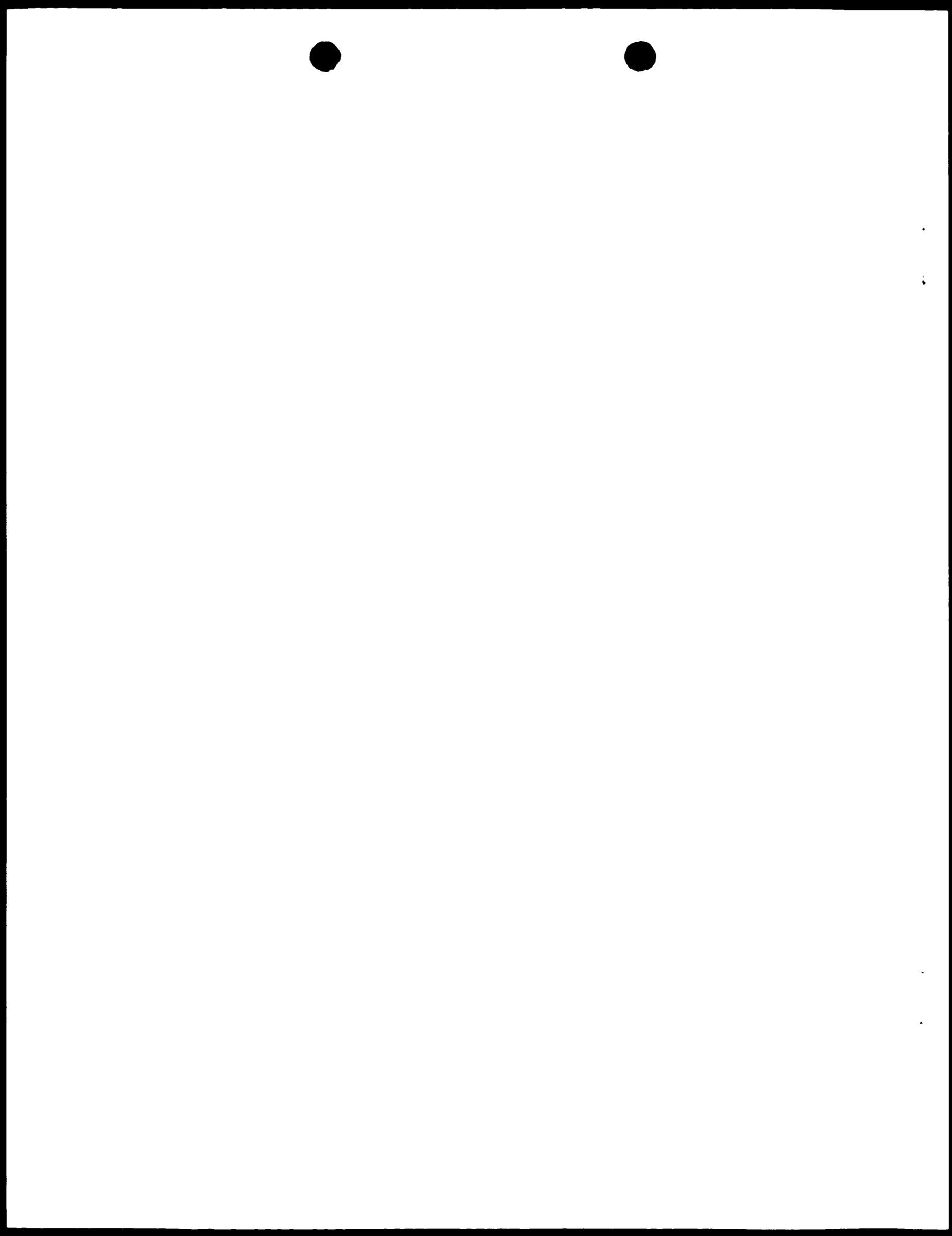
第 1 図



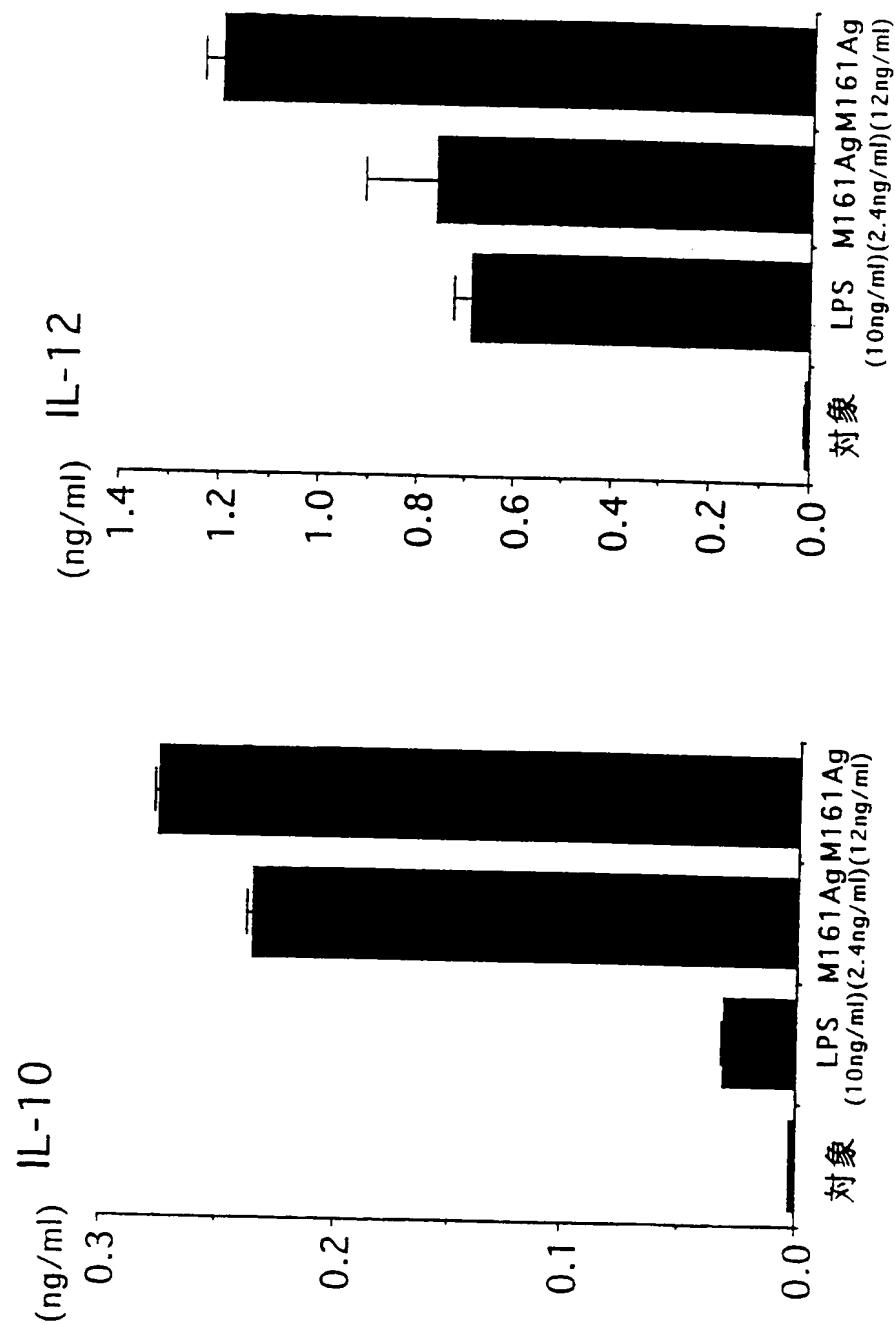


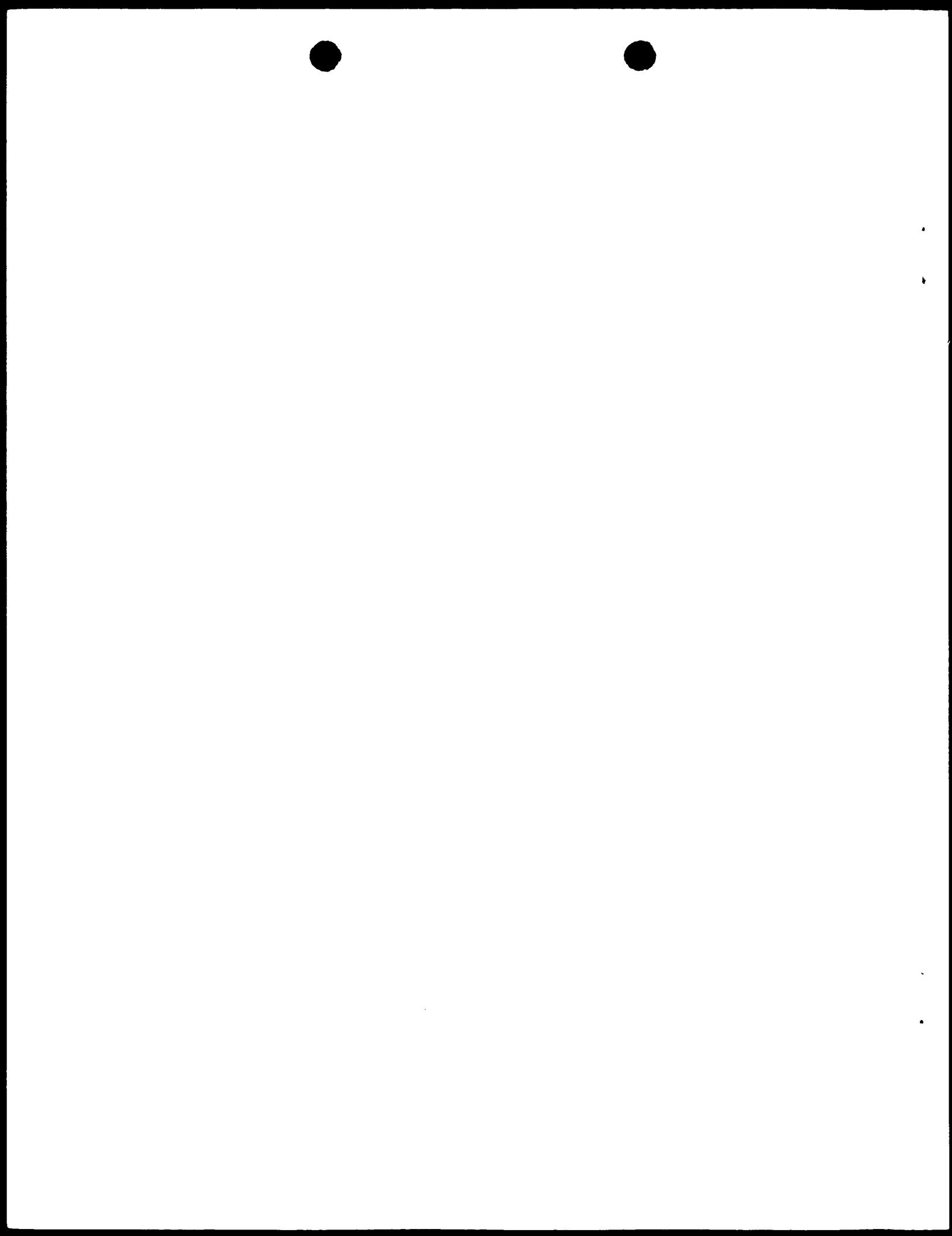
第 2 図





第 3 図





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00414

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61K38/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A61K38/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Swissprot/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	MATSUMOTO, M. et al., "Structural and Functional Properties of Complement-activating Protein M161Ag, a <i>Mycoplasma fermentans</i> Gene Product That Induces Cytokine Production by Human Monocytes," J. Biol. Chem., 15 May 1998, Vol. 273, No. 20, p.12407-12414, Refer to the full text	1-6, 9, 10
A	JP, 9-157295, A (Japan Science and Technology Corp.), 17 June, 1997 (17. 06. 97), Refer to the full text (Family: none)	1-6, 9, 10
A	RAWADI, G. et al., "Effects of <i>Mycoplasma fermentans</i> on the Myelomonocytic Lineage," J. Immunol., 1996, Vol. 156, p.670-678, Refer to the full text	1-6, 9, 10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
7 April, 1999 (07. 04. 99)

Date of mailing of the international search report
20 April, 1999 (20. 04. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00414

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 7, 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7 and 8 pertain to methods for prevention or treatment of the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類 (IPC))
Int. C 11 A 61 K 38/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類 (IPC))
Int. C 11 A 61 K 38/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Swissprot/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDB J/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	MATSUMOTO, M. et al., 'Structural and Functional Properties of Complement-activating Protein M161Ag, a <i>Mycoplasma fermentans</i> Gene Product That Induces Cytokine Production by Human Monocytes,' J. Biol. Chem., 15 May 1998, Vol. 273, No. 20, p. 12407-12414, 全文参照	1-6, 9, 10
A	J P, 9-157295, A (科学技術振興事業団), 17. 6月. 1997 (17. 06. 97), 全文参照, ファミリーなし	1-6, 9, 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に付及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとつて自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 07. 04. 99	国際調査報告の発送日 20.04.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA / J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 大宅 郁治 電話番号 03-3581-1101 内線 6602 4 C 9639

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	RAWADI, G. et al., 'Effects of <i>Mycoplasma fermentans</i> on the Myelomonocytic Lineage,' <i>J. Immunol.</i> , 1996, Vol. 156, p. 670-678, 全文参照	1-6, 9, 10